

杯状病毒的分类和分子生物学研究进展

毛春生 金宁一 殷震

(解放军农牧大学研究所, 长春 130062)

Classification and Molecular Biology of Calicivirus

Mao Chunsheng Jin Ningyi Yin Zhen

(Research Institute, University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062)

关键词 杯状病毒, 分子生物学, 分类

Key words Calicivirus, Molecular biology, Classification

典型的杯状病毒呈球形或近球形, 直径 30~35 nm, 无囊膜, 核衣壳呈二十面体对称, 由 32 个壳粒组成, 核衣壳上整齐地排列着暗色中空的杯状结构, 这种杯状结构在正二十面体的 20 个面及 12 个顶点各有一个。但兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)、诺沃克病毒(Norwalk virus, NV)、戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)的衣壳上的这种杯状结构在电镜下并不十分清楚^[2,5]。杯状病毒的分子量大约为 15×10^6 , $S_{20w} = 170 \sim 187$, 氯化铯中的浮密度为 $1.33 \sim 1.40 \text{ g/cm}^3$, 酒石酸钾-甘油中的浮密度为 1.29 g/cm^3 , 对乙醚、氯仿和温和性去污剂敏感, pH 3~5 可将其灭活, 高浓度的 Mg^{2+} 能够加快热对杯状病毒的灭活作用^[3]。杯状病毒主要引起人和动物的胃肠炎, 导致腹泻; 在动物还可能引起皮肤、粘膜损伤, 甚至败血症。多数病毒不能在体外培养, 但圣米吉尔海狮病毒(San Miguel sea-lion virus, SMSV)、猪水疱疹病毒(Vesicular exanthema virus, VESV)、猫杯状病毒(Feline calicivirus, FCV)可在体外继代, 病毒在胞浆中合成和成熟, 有时呈晶格状排列^[1,2,5]。

1 杯状病毒的 RNA 和基因组结构

以前曾报道, 杯状病毒的 RNA 在电泳时有 8 个条带^[4], 现在证实只有两条, 其余条带为基因组 RNA 的剪切产物或实验过程中人为造成的降解^[5]。这两条带分别为基因组 RNA(Genomic RNA)和亚基因组 mRNA(Subgenomic mRNA)。基因组 RNA 为单股、正链 RNA(ssRNA), 分子量为 $2.6 \sim 2.8 \times 10^6$, 它既可以作为 mRNA, 直接翻译病毒蛋白, 又可作为负股 RNA 的模板, 进行复制^[3,5]。目前已完成了 FCV^[2]、RHDV^[6]、HEV^[7]、NV^[8]、南安普顿病毒(Southampton virus, SHV)^[9]等几种主要杯状病毒的序列测定, 病毒含有 7437(RHDV)个至 7696(SHV)个核苷酸, 其它杯状病毒如欧洲棕色野兔综合症病毒(European brown hare syndrome virus, EBHSV)^[10]、SMSV^[11]等的部分序列也已测定。

本文于 1995 年 8 月 2 日收到, 11 月 6 日修回

杯状病毒基因组为单股正链 RNA,长 7.4~7.7 kb, 3'末端为 poly(A)结构,大多数杯状病毒基因组的 5'末端无帽状结构,而与一个小分子蛋白共价连接,此蛋白称 VPg^[2-4,6,8,9],但 HEV 基因组的 5'末端为经典的帽状结构。

各种杯状病毒的基因组结构相似,基因组中包含有 2~4 个开放阅读框架(ORF):FCV 和 NV 有 3 个 ORF,5'端 ORF 称 ORF1,长约 5.5 kb,占基因组全长的 80%,编码非结构蛋白前体,中间的 ORF(ORF2)编码结构蛋白(即衣壳蛋白),3'端 ORF(ORF3)可能编码一个小蛋白^[2-9],HEV ORF3 的位置略有不同,它相应的核苷酸序列重叠于 HEV 的 ORF1 和 ORF2。分析南安普顿病毒(SHV)的核苷酸序列,还发现了一个小的 ORF(ORF4),它重叠于 ORF2 和 ORF3 之间,能编码 110 氨基酸碱基的蛋白质,功能不明^[9]。RHDV、EBHSV 的基因组结构与 FCV、NV 略有不同,只含有两个 ORF,它的非结构蛋白和衣壳蛋白由同一个 ORF(ORF1/ORF2)编码,即前二者的 ORF1 相当于后二者的 ORF2^[6,10]。杯状病毒粒子中还含有丰富的亚基因组 mRNA,其大小为 2.2~2.4 kb,它与基因组 RNA 具有相同的 3'末端,向 5'末端延伸到 ORF2,与衣壳蛋白基因相对应^[2-11]。

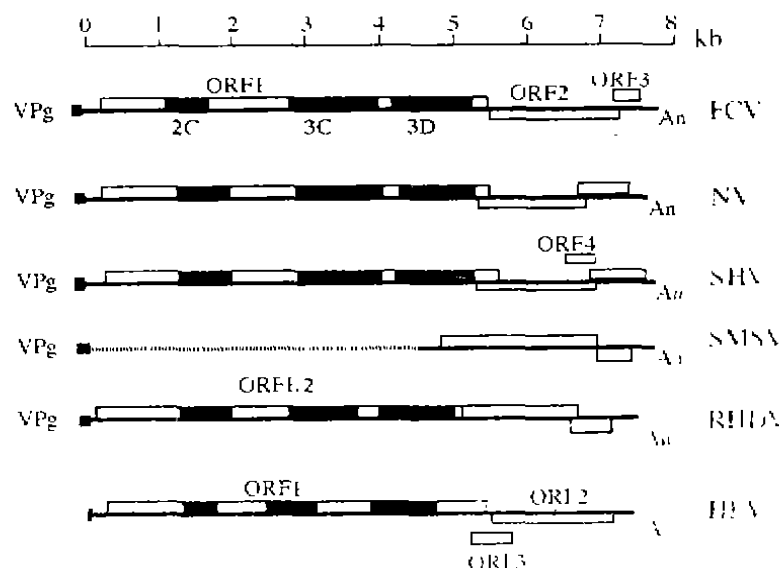


图 几种主要杯状病毒的基因组结构

Fig Schematic genomic structure of the major caliciviruses

尽管几种主要的杯状病毒的核苷酸序列已经清楚,但尚未将编码 VPg 的基因进行定位^[8]。

2 杯状病毒的蛋白

杯状病毒的结构蛋白只有一种,即衣壳蛋白,由 180 个单一结构蛋白的单体组成,单体的分子量为 59~65 kDa^[2-12]。衣壳蛋白能够自我装配成病毒样粒子^[13]。不同杯状病毒衣壳蛋白之间的同源性很高,特别是 N 端和 C 端,并且都含有一个大约 250 个氨基酸的保守区,类似的保守区也存在于小 RNA 病毒的 VP₃ 蛋白中。在不同病毒之间存在这一高度保守的氨基酸序列,提示该区域在病毒的复制和/或装配中具有重要作用^[5,10,11,14]。不同杯状病毒衣壳蛋

白的产生方式也有差别,RHDV和EBHSV的衣壳蛋白以亚基因组 mRNA 直接翻译为主,也可由基因组 RNA 翻译产生的前体经加工产生^[6,10],FCV和SMSV的衣壳蛋白主要由基因组 RNA 翻译产生的前体蛋白经酶切加工产生^[2,13],NV的衣壳蛋白的产生方式与RHDV类似,但由基因组 RNA 翻译的产物不需加工即为成熟的衣壳蛋白^[8]。

已经证明NV的衣壳蛋白(58 kDa)可被胰蛋白酶水解为32 kDa的可溶性蛋白,胰蛋白酶作用位点在各种诺沃克病毒中均存在。但已装配的衣壳蛋白则不能被胰蛋白酶水解^[14]。Hardy根据NV志愿感染者粪便中发现的30 kDa可溶性蛋白与上述32 kDa可溶性蛋白的N端相同、以及二者在免疫电泳和Western Blot试验中所处的位置相似的事实,认为二者实质上是同一蛋白^[14]。NV重组的杆状病毒中也发现了这一蛋白^[13],类似的蛋白还发现于FCV(40 kDa)的细胞培养物^[14]和RHDV(30 kDa)的肝抽提物^[6]中。值得注意的是,这类蛋白并不存在于病毒粒子中,这一点与口蹄疫病毒的VLA抗原非常相似,有关该蛋白的免疫学和病理学作用尚待进一步研究。

不同杯状病毒衣壳蛋白的N端和C端的同源性很高,而中间部分的变异较大^[2,6,10]。据推测,非结构蛋白由一个前体蛋白经蛋白酶水解产生,主要有三种,因为它们的氨基酸组成分别与小RNA病毒有2C蛋白、3C蛋白、3D蛋白等有很高的同源性,故分别称为2C样蛋白、3C样蛋白和3D样蛋白^[2-10]。2C样蛋白是一种螺旋酶,其中含有核苷酸结合功能元件(Nucleotide binding motif)GxxGxGKT/S;3C样蛋白的存在已为短暂表达所证实,无论顺式(*cis-*)还是反式(*trans-*),它均具有胱氨酸蛋白酶活性,该蛋白与病毒蛋白的翻译后加工有关^[8,15];3D样蛋白是一种RNA依赖的RNA聚合酶,与病毒复制有关,RNA聚合酶的几种保守功能元件(Conserved motif)如LKDAEL、GLPSG和YGDD同样也存在于3D样蛋白中,其中YGDD在正链RNA病毒中高度保守^[2,6,8]。

VPg蛋白的分子量为 $10 \cdot 10^3 - 15 \times 10^3$ kDa,共价连接于基因组RNA的5'端,它比小RNA病毒的VPg分子量大,而且为杯状病毒的感染所必需(小RNA病毒的VPg不为其感染所必需)^[2,3,6,8]。

3 衣壳结构

由于不易获得大量提纯的病毒,人们对杆状病毒衣壳结构一直缺乏了解,最近Prasad^[16]等对杆状病毒表达的诺沃克病毒衣壳蛋白形成的病毒样粒子,通过低温电镜技术观察和计算机图像处理技术分析发现,空衣壳直径为38.0 nm,为T=3的正二十面体对称结构,每个壳粒含2个衣壳蛋白,180个衣壳蛋白正好构成90个壳粒,它们整齐排列于每一个2次对称轴处。衣壳结构的最显著特点是壳粒呈弧样(arch-like),壳粒亚单位由3个区域:呈二分叶样的远心区(P2)、中部茎区(P1)和下部壳区(S)构成。

远心区由半径15.0 nm处延伸至19.0 nm处,顶端是一个大约 5.0×7.0 nm的直角平台,构成壳粒的弧样顶部,两弧样结构侧面之间相距约2.0 nm。弧样结构围成约深4.0 nm、宽9.0 nm的空洞,这些空洞位于每一个3次对称轴(共20个)和每一个5次对称轴(共12个)处,从而形成电镜下所见的32个低电子密度的嵌杯样结构。相邻亚单位的下部区(S)相互紧紧相连,构成从半径11.0 nm~15.0 nm处连续的“壳层”。

4 杯状病毒的分类现状

杯状病毒曾被分类为小 RNA 病毒科的一个属——杯状病毒属,1981 年国际病毒分类委员会考虑到该属与其它大多数小 RNA 病毒有较大的不同,而将其提升为科^[3]。杯状病毒无囊膜,直径 30~38 nm,核衣壳上整齐地排列着 32 个暗色中空的杯样结构(科名即由此而来),衣壳仅由一种结构蛋白组成^[3,5,11,15]。这些特点明显不同于大小约为 27 nm、表面光滑、由三种结构蛋白组成衣壳的小 RNA 病毒。但二者在外观形态、基因结构等方面也有许多相似之处,主要表现为它们都无囊膜、核衣壳呈二十面体对称,基因组均为单股正链 RNA、5'末端结合有 VPg 蛋白,此外杯状病毒中也发现类似于小 RNA 病毒的 2C 蛋白、3C 亮氨酸蛋白和 3D RNA 依赖性 RNA 多聚酶等的结构蛋白^[2,6,8]。

杯状病毒科仅有杯状病毒一属,其主要成员有猪水疱疹病毒(VESV)^[3,5]、猫杯状病毒(FCV)^[3-5,18]、圣米吉尔海狮病毒(SMSV)^[3,5]、犬杯状病毒(CCV)^[3,5];大多数学者认为,兔出血症病毒(RHDV)^[1,5,19,20]、人戊型肝炎病毒(HEV)^[5,7,8]、诺沃克病毒(NV)和类诺沃克病毒(Norwalk-like virus)^[3,5,8,25-33]等亦为杯状病毒科的重要成员,此外在人和多种动物如牛、貂、猪、海象、海豚、兔、鸡、爬行动物、两栖动物和昆虫中也发现了多种具有典型杯状病毒形态的病毒粒子,但都未被全面鉴定,尚不能完全肯定其是否为杯状病毒科成员^[3,21-24]。国际病毒分类委员会在其第六次报告中将杯状病毒作如下分类(见附表)。

诺沃克病毒(Norwalk virus, NV)和类诺沃克病毒的各地分离株很多,并常以分离地点命名,如美国发现的雪山病原(Snow Mountain agent)^[5,26-28]、夏威夷病原(Hawaii agent)^[29,30]、Taunto 病原(Taunto agent)^[2,29,30]、Moutgomery County 病原(Moutgomery County agent)^[14,27]、南安普顿病毒(SHV)^[9]、荒漠病毒(Desert shield virus)^[14,29,30]、多伦多病毒(Toronto virus)^[14,31]、英国发现的小圆结构病毒英国 1~4 型(Small round structured viruses UK 1~4, SRSV UK1~4)^[5,32,33]、日本发现的小圆结构病毒日本 1~9 型(SRSV Japan 1~9)等^[5,14,34]。人类的杯状病毒主要引起病毒性胃肠炎。

最初杯状病毒是依据其嵌杯样的外观而分类的,但有些病毒并没有典型的形态学特征,给某些成员的分类造成了困难,如诺沃克病毒(NV)至今尚未成为该科病毒的肯定成员。目前主要是根据形态特征、结合基因组结构而分类的,RHDV、EBHSV、NV 就是据此而归为杯状病毒的。不过这一分类标准应用于戊型肝炎病毒(HEV)仍有困难,HEV 具有杯状病毒的大多数形态学特征,但其 ORF1 与其它杯状病毒的同源性较低,只有 10~20%;它的 ORF3 位于 ORF1 与 ORF2 之间,而不是 ORF2 之后;更重要的是,最近通过计算机分析发现,HEV 基因组 5'端存在有帽功能元件(Capping function motif)^[35],如果 HEV 的 RNA 确实帽化而不是与 VPg 相连,那么就应当为 HEV 另外设立一个分类群。

杯状病毒除与小 RNA 病毒有很多相似之处外,在分子生物学上与甲病毒也有不少共同点,主要表现为:(1)衣壳蛋白均可由基因组 RNA 翻译产生,也可由亚基因组 RNA 直接编码;(2)RNA 多聚酶基因均位于非结构基因区的 3'端。因此,杯状病毒科的分类地位应介于小 RNA 病毒科和甲病毒科之间,并和小 RNA 病毒科、甲病毒科、弹状病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、布尼安病毒科、嵌砂样病毒科一起构成第一个明确的病毒目——单链正股 RNA 病毒目。

表 杯状病毒的成员

Table Members in Caliciviridae

病毒 Virus	血清型 Serotype	易感动物 Susceptible animals	感染类型 Infectious	文献 References
肯定成员				
Established member				
猪水疱疹病毒 Vesicular exanthema of swine	13	猪 Swine	水疱疹 Vesicular	3, 5
圣米吉尔海狮病毒(SMSV) San Miguel sealion virus	16 或更多	海狮等水生动物 Sealion and other marine animals	水疱疹 Vesicular	3, 5
猫杯状病毒(FCV) Feline calicivirus	1(相关株很多) 1(numerous related strains)	猫, 猎豹 Feline, Cheetah	呼吸道、口腔感染 Respiratory oral vesiculation	3—5, 18
犬杯状病毒 Canine calicivirus	2?	犬 Canine	1 肠炎(腹泻) 1 水疱疹 1 Enteric(Diarrhea) 1 Vesicular	2, 3, 23
兔出血病病毒(RHDV) Rabbit haemorrhagic disease virus	1	兔 Rabbit	出血症 Haemorrhagic	1, 19, 20
人杯状病毒(多株) Human caliciviruses	5	人 Human	胃肠炎(腹泻) Enteric(diarrhea)	3, 5, 8
戊型肝炎病毒(HEV) Hepatitis E virus	1	人 Human	肝炎 Hepatitis	5, 7, 8
可能成员				
Candidate member				
欧洲棕色野兔综合征病毒(EBHSV) European brown hare syndrome virus	1	野兔 Hare	急性坏死性肝炎 Hepatitis	5, 10
猪肠道病毒(PoCV) Porcine enteric virus	?	猪 porcine	胃肠炎(腹泻) Enteric(diarrhea)	3, 21
禽杯状病毒(FCVV) Fowl calicivirus	?	鸡 Chicken	生长不良 Stunting	3, 22
牛肠道杯状病毒(BoCV) Bovine enteric calicivirus	?	牛 Cattle	胃肠炎(腹泻) Enteric(diarrhea)	3, 24
貂杯状病毒(MCV) Mink calicivirus	?	貂 Mink	呼吸道感染 Respiratory	3
灵长动物杯状病毒(PCV) Primate calicivirus	?	猴 Monkey	粘膜水疱疹, 持续感染 Mucosal vesiculation, Persistent infection	1
Amyelosis chronic stunt virus(ACSV)	?	昆虫 Insects	生长不良 Stunting	3, 25

参 考 文 献

- 1 刘胜江, 薛华平, 浦伯清, 等. 兔的一种新病毒病——兔的病毒性出血症. 畜牧与兽医, 1984; 6: 253~255
- 2 Carter M J, Milton L D, Meanger J, *et al.* The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology*, 1992; 190: 443~448
- 3 Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H J, *et al.* Virus Taxonomy—Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses Springer-Verlag Wien, New York, 1995; 359~362
- 4 Neill J D, Mengeling W L. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res*, 1988; 11: 143~152
- 5 Carter M J. Genomic organization and expression of astrovirus and calicivirus. *Arch Virol(Suppl)*, 1994; 9: s 429~s 439
- 6 Meyers G, Wirblich C, Thiel H J. Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of calicivirus genome. *Virology*, 1991; 184: 664~676
- 7 Tam A W, Smith M M, Gurra M E, *et al.* Hepatitis E virus(HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 1991; 125: 120~131
- 8 Jiang X, Wang, M, Wang K *et al.* Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 1993; 195: 51~61
- 9 Lambden, P. R, Caul E O, Ashley C R, *et al.* Sequence and genomic organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus.

- Science, 1993;259:516~519
- 10 Wurblich C, Meyers G, Ohlinger V F, *et al.* European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit haemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol*, 1994;68:5164~5173
 - 11 Neill J D. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel Sea-lion virus: identification of conserved and non-conserved amino acid sequence among calicivirus capsid proteins. *Virus Res*, 1992;24:221~222
 - 12 Neill J D, Reardon I M, Heinrisson R L. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein of calicivirus. *J Virol*, 1991;65:5440~5447
 - 13 Jiang X, Wang M, Graham D Y, *et al.* Expression, self-assemble and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, 1992;66:6527~6532
 - 14 Hardy M E, White L J, Ball J M, *et al.* Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, 1995;69:1693~1698
 - 15 Bonioti B, Wurblich C, Sibia M, *et al.* Identification and characterization of 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol*, 1994;68:6487~6495
 - 16 Resad B V V, Rothnagel R, Jing X, *et al.* Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsid. *J Virol*, 1994;68:5117~5125
 - 17 Carter M J. Feline calicivirus protein synthesis investigated by Western blotting. *Arch Virol*, 1989;108:69~79
 - 18 Dawson S, McArdle F, Bennett M *et al.* Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. *The Veterinary Record*, 1993;3:13~17
 - 19 Parra F, Prieto M. Purification of a calicivirus as the causative agent of lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, 1990;64:4013~4015
 - 20 Ohlinger V F, Hess B, Meyers G, *et al.* Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, 1990;64:3331~3336
 - 21 Saif L J, Bohl K W, Theil R F, *et al.* Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23 nm virus-like particle associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol*, 1980;12:105~111
 - 22 Cubitt W D, Barrett A D T. Propagation and preliminary characterization of chick candidate calicivirus. *J Gen Virol*, 1985;66:1431~1438
 - 23 Schaffer F L, Soergel M E, Black D E, *et al.* Characterization of a new calicivirus isolated from feces of a dog. *Arch Virol*, 1985;84:181~195
 - 24 Wood, G N, Bridger J C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol*, 1978;11:441~452
 - 25 Hillman B, Morris T J, Kellen W R *et al.* An invertebrate calici-like virus; Evidence for partial virion disintegration in host excreta. *J Gen Virol*, 1982;60:115~123
 - 26 Morens D M, Zweighaft R M, Vernon T M, *et al.* A waterborne outbreak of gastroenteritis with secondary person-to-person spread association with a viral agent. *Lancet*, 1979;1:964~966
 - 27 Madore H, Treano J J, Dolin R. Characterization of the Snow Mountain agent of viral gastroenteritis. *J Virol*, 1986;68:3391~3396
 - 28 Kalkan A R, Wyatt R G, Dolin R, *et al.* Visualization by immune electron microscope of a 27 nm particle associated with acute ingestive non-bacterial gastroenteritis. *J Virol*, 1972;10:1075~1080
 - 29 Wyatt R G, Dolin R, Blackow N R, *et al.* Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis*, 1974;12:709~714
 - 30 Lew J F, Kapikian A Z, Valdesuso J, *et al.* Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human calicivirus. *J Infect Dis*, 1994;170:535~542
 - 31 Lew J F, Kapikian A Z, Jiang X, *et al.* Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol*, 1994;68:3391~3396
 - 32 Lewis D C. Three serotypes of Norwalk-like virus demonstrated by solid-phase immune electron microscope. *J Med Virol*, 1990;30:77~81
 - 33 Lewis D C. Nowalk agent and other small-round structural viruses in the U.K. *J Infect*, 1991;23:220~222
 - 34 Okada S, Sekine S, Ando T, *et al.* Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. *J Clin Microbiol*, 1990;28:1244~1248
 - 35 Koonin E V, Gorbalenya A E, Purdy M A, *et al.* Computer-assisted alignment of functional domains in the non-structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:8259~8263